

联合色谱法和 UV 评价中药制剂体外溶出度

张玉军^{1*}, 麦意梅², 莫志江³

- (1. 广西壮族自治区药品和医疗器械集中采购服务中心, 南宁 530021;
2. 广州市药检所二分所, 广州 5102501;
3. 广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 探讨联合色谱法和 UV 用于评价中药制剂体外溶出度的可行性。方法: 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCL 为释放介质, 小柴胡片为研究对象, 按《中国药典》2005 年版测定该制剂的体外溶出度, 采用 UV 测定释放液在 272 nm 处吸收度, 通过 HPLC 测定黄芩苷含量。释放液的 UV 吸收成分被分解为特定成分(黄芩苷)和非特定成分(除黄芩苷外的成分)两部分。结果: HPLC 可反映特定成分黄芩苷的溶出度; 通过扣除释放液中黄芩苷的 UV 吸收值, UV 可用于描述非特定成分的溶出度。结论: 联合色谱法和 UV 可较好地评价中药制剂的体外溶出度。

[关键词] 小柴胡片; 体外溶出度; 测定; 评价

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0017-05

[doi] 10.11653/syfy2013110017

Investigation of Determination and Evaluation for *in vitro* Dissolution of Chinese Medicine Preparations by Co-Chromatography and UV

ZHANG Yu-jun^{1*}, MAI Yi-mei², MO Zhi-jiang³

- (1. Medicines and Medical Equipment Centralized Purchasing Service Center of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China;
2. No. 2 of Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510251, China;
3. The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

[收稿日期] 20121205(011)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅课题(桂卫 Z2010256)

[通讯作者] * 张玉军, 副主任中药师, 在职硕士研究生, 从事中药药物研究, Tel: 0771-2801500, E-mail: Zhangyj20@126.com

工艺条件的方法是可行的。该方法既不需要增加试验次数, 又能定量分析因素变化规律和寻找最佳参数组合, 为其他中药有效成分的提取工艺提供了一个新思路。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 155.
[2] 李爽, 于庆海, 金佩珂. 鱼腥草的有效成分、药理作用及临床应用的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(2): 144.
[3] 张建新. 微波提取鱼腥草水溶性多糖清除自由基特性的研究[J]. 食品科技, 2006, 31(8): 115.

- [4] 孟江, 周毅生, 廖华卫. 超声波提取鱼腥草多糖工艺研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 17.
[5] 嵇文亚, 孟江. 碱法提取鱼腥草多糖的工艺研究[J]. 齐鲁药事, 2008, 27(1): 44.
[6] 嵇文亚, 孟江, 徐玉茵. 酸法提取鱼腥草多糖工艺研究[J]. 河南中医学报, 2008, 23(3): 22.
[7] 黄秀香, 赖红芳, 罗丽程. 超声波协同复合酶法提取半边莲多糖工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 44.
[8] 展学孔, 周海妹, 马小花, 等. 海参多糖提取新工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 40.
[9] 闻新, 周露, 王丹力, 等. MATLAB 在神经网络中的设计与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 207.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] **Objective:** To investigate feasibility of UV and co-chromatography for evaluating *in vitro* dissolution of Chinese medicine preparations. **Method:** With $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ hydrochloric acid as release medium, *in vitro* dissolution of Xiaochaihu tablets was determined according to the 2005 edition of ‘Chinese Pharmacopoeia’, absorbance of release solution at 272 nm was determined by UV, the content of baicaline was determined by HPLC. UV absorption ingredients of this solution were divided into two parts—the defined ingredient (baicaline) and the undefined ingredients (other ingredients). **Result:** HPLC could reflect dissolution of baicaline (the defined ingredient); UV could describe dissolution of other ingredients through deducting UV absorption of baicaline from release solution. **Conclusion:** *In vitro* dissolution of Chinese medicine preparations could be better measured and assessed by co-chromatography and UV.

[Key words] Xiaochaihu tablets; *in vitro* dissolution; evaluation

目前,中药制剂体外溶出度的测定方法主要有色谱法(HPLC, GC等)^[1-3]和紫外分光光度法(UV)^[4-5]。前者专属性强,符合化学药品的起效方式,有成为“标准”方法的趋势;UV虽因专属性差而备受质疑,但中医药理论强调以整体方式起效,且绝大部分中药或中药制剂的起效成分不明确(目前所谓的“有效成分”并不被中医广泛认可),因此至今仍得到广泛应用。本实验结合中医药理论,汲取HPLC和UV各自的优点,联合用于测定小柴胡片的体外溶出度,旨在总结归纳出一个全面评价中药制剂体外溶出度的方法。

1 材料

LC-10AS型高效液相色谱仪(日本岛津公司),UV-2201型紫外分光光度计(日本岛津公司),D-800LS型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司),AUW220D型电子天平(日本岛津公司)。

黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号110715-2005114),小柴胡片(薄膜衣片,0.4 g/片,广东环球制药有限公司,批号070603),小柴胡颗粒阴性对照(广东环球制药有限公司),甲醇为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶出度测定 取6片小柴胡片分置于溶出试验仪的6个篮内,按《中国药典》2005年版二部附录XC溶出度测定(转篮法)项下操作^[6]。以900 mL的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl为释放介质,温度(37.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别在5,10,20,30,40,50,60,70,80 min用装有过滤器的注射器抽出释放液4 mL,同时补充等体积释放介质,至120 min时压碎仍未完全溶解的残余药片使其充分溶解,取样4 mL。

2.2 HPLC测定释放液

2.2.1 阴性对照溶液的制备 称取小柴胡颗粒阴性对照0.41 g(小柴胡片的平均片重)充分溶解于

900 mL释放介质中,过滤,备用。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品10.54 mg,置100 mL量瓶中,用50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得对照品贮备液。精密吸取该贮备液10 mL置200 mL量瓶中,用50%甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 $5.270 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 SPD-10A型紫外可见光检测器, Hypersil C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μm),CTO-10A型柱温箱,柱温 40°C ,流动相甲醇-水-磷酸(47:53:0.2),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长272 nm,进样量20 μL ,见图1。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取黄芩苷对照品贮备液0.5,1,2,3,4,5,6 mL,分别置于100 mL量瓶中,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,进样,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,黄芩苷质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 2.71 \times 10^7 X + 600.94$ ($r = 0.9998$),表明黄芩苷在 $0.5 \sim 6.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好线性关系。

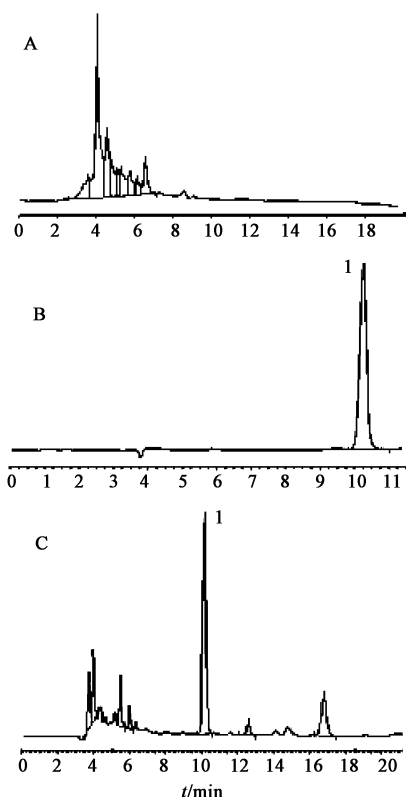
2.2.5 精密度试验 精密吸取黄芩苷对照品溶液20 μL ,重复进样6次,结果峰面积的RSD 0.90%。

2.2.6 稳定性试验 取新配制的黄芩苷对照品溶液适量,于0,2,4,6,8,10,12,24,48 h内分别进样20 μL ,结果黄芩苷峰面积的RSD 1.10%,表明对照品溶液在48 h内稳定。

2.2.7 加样回收率试验 精密吸取已知黄芩苷质量浓度($6.993 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的120 min释放液4份,每份3 mL,分置10 mL量瓶中,加 $5.270 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩苷对照品溶液1,1,2,4 mL,用50%甲醇稀释至刻度,摇匀,进样20 μL ,依法测定,结果黄芩苷的回收率分别为110.8%,103.5%,102.9%,99.05%。

2.3 UV测定释放液

2.3.1 释放液的测定 以释放介质为空白,扫描小



A. 阴性对照;B. 对照品;C. 供试品;1. 黄芩苷

图1 小柴胡片 HPLC

柴胡片释放液的 UV 吸收光谱;以黄芩苷对照溶液的溶剂为空白,扫描黄芩苷对照品的 UV 吸收光谱。结果发现释放液在 272 nm 处的最大吸收峰与黄芩苷特征吸收峰基本相符,故选定 272 nm 为 UV 检测波长。

2.3.2 UV 吸收值的分解 小柴胡片的 UV 吸收有 2 个来源(黄芩苷和非黄芩苷)。其中,黄芩苷成分已明确,本试验称之为特定成分,代表 UV 的专属性;非黄芩苷是一些成分不明确的混合物,称为非特定成分,代表 UV 的非专属性。于 272 nm 处测得 $10.40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩苷对照溶液的吸收度 (A) 0.602 7,120 min 释放液的 $A = 1.213 6$;按上述 HPLC 测得 120 min 释放液黄芩苷质量浓度 $7.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

$$\text{专属性}(272 \text{ nm}) = \frac{C_{120 \text{ min 释放液}}}{C_{\text{黄芩苷对照}}} \times A_{\text{黄芩苷对照}}^{272 \text{ nm}} / A_{120 \text{ min 释放液}}^{272 \text{ nm}} = \frac{7.05}{10.40} \times 0.602 7 / 1.213 6 = 0.34$$

说明对于本例,专属性(272 nm)0.34 的含义即为 UV 吸收有 34% 来源于黄芩苷。显然,非专属性(272 nm) = 1 - 专属性(272 nm) = 0.66。

$$A_{\text{非特定成分}}(272 \text{ nm}) = A_{\text{释放液}}^{272 \text{ nm}} - \frac{C_{\text{释放液}}}{C_{\text{黄芩苷对照}}} \times A_{\text{黄芩苷对照}}^{272 \text{ nm}}$$

根据公式 2 计算各时间点释放液的非特定成分的 A ,计算非特定成分的溶出度,结果特定成分(黄芩苷)的溶出度与 HPLC 完全一致,因此不必另行计算。

2.3.3 线性关系考察 将 120 min 完全溶解的释放液过滤,滤液指定为 100% 的相对体积分数,用释放介质稀释成 80%,60%,40%,20%,10%,5% 的系列体积分数。以释放介质为空白,分别在 272 nm 处测定 A 。以相对体积分数为横座标, A 为纵座标,得回归方程 $Y = 0.962 7X + 0.003 9$ ($r = 0.999 9$),表明在此条件下释放液的 A 变化遵循线性关系。

2.3.4 精密度试验 在溶出度测定试验完成后,重复测定同一份 120 min 释放液的 A 5 次,结果 A 的 RSD 0.12%。

2.3.5 稳定性试验 在溶出度测定试验完成后,以 120 min 释放液的 A 为起点,每隔 1 h 测定 1 次,结果 A 的 RSD 0.22%,表明释放液在 5 h 内稳定。

2.4 累积溶出度的计算 采用自身对照法,以 120 min 释放液的数据当作完全溶出(100%),计算各个时间点的累积溶出度,结果见表 1。

2.5 溶出参数的估算 在 SPSS 的非线性回归中输入 $100 \times \text{CDF. Weibull}(t, \lambda, \gamma)$ 调用内置的 Weibull 累积分布函数拟合表 2 中数据^[7],求出 λ (尺度参数)和 γ (形状参数),同时得到拟合优度 (R^2)。 λ 和 γ 确定后,在 transform → compute 对话框中输入 IDF. Weibull(累积溶出率/100, λ, γ) 调用内置的 Weibull 逆分布函数,指定具体的 λ 和 γ ,再分别用 50 和 90 取代累积溶出率即可计算 t_{50}, t_{90} ,见表 2。结果, HPLC 和 UV 的累积溶出度均严格遵循 Weibull 模型,表明 2 种方法均可用于描述小柴胡片的溶出状况。

2.6 UV 和 HPLC 的比较 使用 SPSS 16.0 for Windows,包括溶出参数的估算(非线性回归)和配对 t 检验。表 1 和表 2 中溶出度和溶出参数的配对 t 检验结果见表 3。

由表 3 可知,5 min 前黄芩苷的溶出较少,主要是一些溶出较快的其他成分释放出来,故 UV 的溶出度结果偏高;其后占 UV 吸收成分 1/3 的黄芩苷(UV 的专属性 0.34)开始大量溶出,至 10 min 时 UV 和 HPLC 基本相当;再往后,黄芩苷的溶出不断增加,HPLC 结果逐渐偏高,至 50 min 时已偏高约 5.8 min;随后,黄芩苷的释放基本完全(50 min 时已溶出 95%),但小柴胡片中其他一些 UV 吸收成分的释放仍然继续(同时表明这些成分未充分溶出),

表 1 小柴胡片的累积溶出率测定

%

方法	药片号	t/min								
		5	10	20	30	40	50	60	70	80
UV	1	3.50	11.21	30.67	53.87	72.12	86.45	91.87	94.25	94.80
	2	4.42	15.97	40.54	62.42	79.16	88.86	92.01	94.64	94.85
	3	5.29	15.42	40.09	60.73	76.20	88.21	91.88	93.95	95.11
	4	5.52	15.30	40.36	60.92	77.08	91.33	94.46	95.21	98.13
	5	3.37	14.39	36.08	58.19	75.70	89.51	93.88	92.87 ¹⁾	96.80
	6	5.22	16.55	38.15	62.69	84.82	92.91	96.37	98.65	97.56 ¹⁾
HPLC	1	0.15	9.29	32.14	60.19	72.73	93.63	95.62	99.17	98.23 ¹⁾
	2	3.19	17.75	41.66	65.16	86.57	96.12	96.92	99.87	99.46 ¹⁾
	3	4.28	15.41	40.92	64.48	79.95	95.97	98.03	98.59	99.50
	4	3.60	15.75	41.64	64.28	78.10	96.13	98.09	98.03 ¹⁾	99.60
	5	0.00	13.54	38.71	63.46	81.34	93.82	98.97	100.65 ¹⁾	100.01 ¹⁾
	6	0.00	16.06	40.22	62.25	87.88	96.26	97.88	99.64	100.45 ¹⁾
非特定成分	1	5.16	12.16	29.95	50.75	71.81	82.91	90.03	91.81	93.10
	2	5.02	15.09	39.99	61.07	75.52	85.30	89.60	92.07	92.59
	3	5.80	15.42	39.68	58.87	74.34	84.36	88.84	91.65	92.94
	4	6.50	15.08	39.71	59.21	76.56	88.89	92.61	93.78	97.39
	5	5.03	14.81	34.79	55.60	72.93	87.39	91.38	89.05 ¹⁾	95.22
	6	7.87	16.81	37.10	62.91	83.27	91.22	95.61	98.14 ¹⁾	96.10 ¹⁾

注：¹⁾当接近完全释放时(>90%)，未释放的溶质逐渐减少，而取样造成的溶质损失开始加大，且存在测量误差等因素，累积溶出率不一定呈现理论上的非下降趋势，同理也可能略微超出100%的理论极限值。

表 2 小柴胡片溶出参数的拟合

方法	药片号	λ	γ	R^2	t_{50}/min	t_{90}/min
UV	1	34.921	1.717	0.998	28.21	56.76
	2	30.698	1.517	0.997	24.11	53.20
	3	31.570	1.489	0.998	24.68	55.28
	4	30.749	1.585	0.998	24.40	52.04
	5	32.394	1.632	0.997	25.88	54.00
	6	29.368	1.758	0.998	23.84	47.20
HPLC	1	32.527	1.951	0.996	26.96	49.88
	2	27.999	1.784	0.998	22.80	44.69
	3	29.097	1.746	0.998	23.59	46.91
	4	29.241	1.712	0.997	23.61	47.60
	5	29.677	1.882	0.998	24.43	46.23
	6	28.628	1.920	0.996	23.65	44.20
非特定成分	1	36.296	1.608	0.996	28.90	60.97
	2	32.401	1.404	0.995	24.96	58.69
	3	33.125	1.378	0.997	25.39	60.68
	4	31.613	1.522	0.998	24.85	54.68
	5	34.019	1.514	0.994	26.70	59.02
	6	29.788	1.672	0.996	23.92	49.05

注：平均溶出参数通过表 1 中平均累积溶出度求得，而不是各片溶出参数的平均值。

UV 和 HPLC 的差距开始逐渐减少。由于 t_{50} 约 25 min(表 2)，处于 2 个方法较为接近的位置，故仅相差约 1.0 min； t_{90} 约 50 min(表 2)，处于 2 个方法差距最大的位置，因而差异相对较大，约 6.5 min。非特定成分与 HPLC(特定成分)的溶出情况也遵循同样的规律，只是相差的幅度更大，证实 UV 与 HPLC 的差异是由于特定成分与非特定成分间的溶出差异而造成的。虽然 UV 和 HPLC 的结果存在一定差异，但平均相差仅 2.6%，因此，可考虑单用更为简单快捷的 UV 测定小柴胡片的体外溶出度。

3 讨论

一般来说，在使用自身对照法计算累积溶出度的前提下，若某时间点的 UV 明显 < HPLC，说明制剂中的特定成分(如黄芩苷)至该时刻溶出较快，而其他成分溶出较慢，反之亦然。若试验将近结束 UV 仍明显 < HPLC，说明制剂中仍有一些其他成分未充分溶出，反之表明特定成分仍未充分溶出。

对于其他中药制剂的溶出情况，不难推测 UV 和 HPLC 间的差值可大可小，主要与制剂中各个成分的理化特性有关，需联合该 2 种方法进行试验才能确定。若两者的差值不大，日后可用其中任意一种来描述该制剂的溶出情况，显然应首选 UV。若两者的差值较大，日后必须同时使用该 2 种方法才

表 3 小柴胡片累积溶出度和溶出参数的比较(配对 t 检验)

项目	参数	差值 UV-HPLC	t	P	差值 非特定成分	t	P
累积溶出度	5 min	2.685	4.102	0.009	4.026	4.084	0.010
	10 min	0.174	0.339	0.748	0.260	0.340	0.747
	20 min	-1.565	-5.767	0.002	-2.344	-5.776	0.002
	30 min	-3.500	-3.675	0.014	-5.234	-3.678	0.014
	40 min	-3.582	-3.336	0.021	-5.355	-3.350	0.020
	50 min	-5.778	-7.646	0.001	-8.647	-7.710	0.001
	60 min	-4.171	-6.365	0.001	-6.240	-6.402	0.001
	70 min	-4.398	-4.672	0.005	-6.574	-4.696	0.005
	80 min	-3.331	-7.192	0.001	-4.984	-7.252	0.001
	平均	-2.607			-3.899		
溶出参数	λ	2.088	6.431	0.001	3.346	6.293	0.001
	γ	-0.2162	-9.190	0.000	-0.316	-9.878	0.000
	t_{50}/min	1.013	5.370	0.003	1.613	5.266	0.003
	t_{90}/min	6.495	7.005	0.001	10.597	6.835	0.001

能较全面地描述制剂的溶出状况。

中医药理论讲究君臣佐使,认为不单是中药制剂的某个特定成分,包括其他成分也对疗效产生影响。因此,若中药制剂的特定和非特定成分均能充分溶出,相对可能会发挥较大的疗效,因此使用 UV 测定和评价中药制剂的溶出度是很有必要的,尤其是当 HPLC 和 UV 相差较大时,仅凭 HPLC 并不能充分反映中药制剂的总体溶出情况。参照君臣佐使理论,中药制剂中特定成分(如黄芩苷)和非特定成分的比例有可能与疗效有关,因此质量稳定的制剂应该需长期保持该比例的稳定。

[参考文献]

[1] 姚雪莲,孙涛,彭红,等. HPLC 测定咳特灵胶囊中马来酸氯苯那敏的溶出度[J]. 中国实验方剂学杂

志,2012,18(3):51.

- [2] 盛蓉,陈佳,宋英,等. 吴茱萸碱分散片及吴茱萸碱不同处理的溶出度测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):32.
- [3] 杜守颖,陈雯,吴清,等. 仙灵骨葆胶囊中丹参酮 II A 溶出度测定方法研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(13):1706.
- [4] 张永丽,郑清娉,张卫华,等. 益肝灵分散片的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(10):20.
- [5] 莫志江,危华玲. 银杏叶片的体外溶出度研究[J]. 中国现代应用药学杂志,2003,20(2):137.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:附录 XC.
- [7] 莫志江,危华玲. 利用 SPSS 估算药物体外释放参数[J]. 时珍国医国药,2007,18(6):1419.

[责任编辑 全燕]